

整合素激活因子 Talin 蛋白棒状结构域的双螺旋束结构研究 *

林 霖^{1, 2)} 宋先强¹⁾ 叶 盛^{1)**} 张荣光^{1)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101; (²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 Talin 能够激活整合素(integrin), 同时作为连接细胞骨架与跨膜受体整合素的桥梁, 在细胞黏附、迁移等过程中发挥着关键的调控作用. 整合素的激活反应是通过 Talin-FERM 结构域的 F3 结合整合素 β 亚基的胞内尾段来完成的. Talin 在体内存在自抑制与活化两种状态, 我们之前解析的 F2F3/R9 复合物结构显示, 在自抑制状态下, 整合素结合位点 F3 与其尾部片段 Talin-R9(1654~1822 a.a.)结合, 此时整合素不能被活化. 然而, Talin 作为一个 270 ku 的大蛋白, 除了 F3 和 R9 以外的部分在 Talin 自身的活化过程中如何协同发挥作用, 至今仍是未知的. 我们分别解析了 Talin R9-10(1654~1973 a.a.)、R10-11(1815~2140 a.a.)的双螺旋束晶体结构, 单独的 R9、R10、R11 均为 5-螺旋的螺旋束结构, R9-10 之间通过一条长 α 螺旋连接, R9 和 R10 交错排列在该螺旋的两侧, 夹角约为 150°; R10-11 之间的柔性连接区在周围氢键网络的稳定下, 使 R10 和 R11 形成了约 120°的夹角. 晶体结构中观察到的夹角与前人的小角散射及电镜结果相吻合. 结合已有的 R7-8、R11-12 结构进行重叠, 得到的 R7-12 拼接结构模型表现为伸展的长棒状, R8 则凸出于长棒之外; R10-12 不影响 F3 的结合, 而 R8 不仅在空间上遮盖了 F3 的结合位点, 而且可能通过电荷排斥 F2F3. 凝胶排阻层析实验也证实了这一点. 本工作为进一步阐释 Talin 的自抑制机制提供了分子基础.

关键词 Talin, R9-10, R10-11, 晶体结构, 双螺旋束, 自抑制

学科分类号 Q5, Q6, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0081

Talin 蛋白于 30 年前被人们发现, 广泛存在于胞质中, 并对细胞骨架的组织、细胞外基质黏附有重要作用^[1]. 体外实验表明缺失 Talin 将严重阻碍细胞伸展及细胞-胞外基质连接^[2-4], 而敲除 talin-1 基因对原肠胚时期的小鼠胚胎是致死的^[5]. Talin 在一系列由整合素介导的细胞黏附相关的生理过程中都发挥着关键的调控作用, 如细胞变形、生长、分化、迁移等^[6-7]. Talin 同时具有结合整合素和肌动蛋白的能力, 不仅能够作为接头分子连接细胞骨架与胞外基质^[8], 更能够激活整合素, 使其结合配体的能力从低亲和状态转化为高亲和状态, 进而实现信号由胞内向胞外的传递^[9-11].

全长的 Talin 蛋白含有 2 541 个残基, 单体分子质量约为 270 ku, 由 N 端的头部结构域(1~400 a.a., 分子质量约 47 ku)通过一段柔性区域和 C 端较长的 ROD 尾部结构域(482~2 541 a.a., 分子质

量约 220 ku)连接而成. Talin 头部包含 F0 结构域和一个 FERM (four-point-one-protein/ezrin/radixin/moesin)结构域(由线性排列的 F1、F2、F3 组成)^[12], 其中 F3 的类 PTB(phosphotyrosine-binding domain-like, PTB-like)结构域能够与 β 整合素的胞内段尾部结合, 诱导整合素发生变构, 进而被激活, F0 和 F1 的存在也利于实现整合素(integrin)的最大激活^[13], 分布在 FERM 结构域一侧的连续碱性残基能够与酸性细胞膜磷脂结合, 对于整合素的活化也是不可缺少的^[14]. 尾部柔性的 ROD 结构域含有由 62 个两亲性 α 螺旋组成的 13 个螺旋束(R1-R13), 以

* 国家自然科学基金资助项目(31470792, 31271491).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888637, E-mail: rzhang@ibp.ac.cn

收稿日期: 2015-03-25, 接受日期: 2015-06-01

及 C 端的一个 α 螺旋(dimerization domain, DD), 后者能够和另一 Talin 分子的 DD 形成 coiled-coil 从而介导 Talin 二聚化^[15](图 1a). 每个螺旋束由 4~5 个 α 螺旋组成, 螺旋束内部形成稳定的疏水核心. Talin ROD 结构域起始于一个 5-螺旋束(R1), 其后接着 3 个 4-螺旋束(R2-4); R2 通过丰富的疏水相互作用与 R1 结合形成一个双结构域(double-domain)^[16]. 尽管 R2、R3、R4 之间没有相互作用, 由于 4-螺旋束的 N、C 端位于结构域的同一侧, R1-4 在空间上形成了紧密的排列. R4 之后连接着 8 个 5-螺旋束(R5-7, R9-R13), 由于 5-螺旋束的 N、C 端分别位于结构域的两侧, 因此它们可以形成首尾相接、线性排列的长棒状. 其中唯一的 4-螺旋束 R8 并没有打破这种线性排列, 因为它并非位于 R7 和 R9 之间, 而是插入了 R7 螺旋束的一段 loop 中^[17]. 截至目前, 除了几段柔性区域, Talin 上所有结构域的结构都已通过 NMR 或晶体学方法得到解析^[18], 然而, 除了 R1-2、R7-8 以及 R11-12 的结构是以双结构域的形式得到解析, ROD 尾部的其他结构均是以单个螺旋束分别测定的. 因此, 其他各螺旋束之间的相对朝向与位置关系仍不清楚, 另外突出于连续排列的 ROD 尾部的 R8 究竟发挥着何种作用也是未知的.

为了实现对细胞黏附等动态过程的调控, Talin 存在抑制及活化两种不同的状态, 前人通过凝胶排阻层析、分析型超速离心、电镜观察等实验手段进行了研究, 结果均表明 Talin 在溶液中存在两种构象状态: 紧密折叠的球形状态和松散柔性的伸展状态, 而去掉头部的 Talin 尾部则只呈现伸展的构象状态^[19]. 上述结果提示, 头部和尾部之间可能存在的相互作用对于 Talin 形成球形构象有着重要作用. 后来的功能研究也发现 Talin 尾部的 R9 能够与整合素结合关键位点 F3 相互作用^[20], 形成首尾相接的自抑制状态, 从而阻碍 F3 与整合素结合, 抑制激活过程. 我们曾报道了 Talin 的 F3 与 R9 形成自抑制复合物的晶体结构^[21], R9 与 F3 结合后不仅在空间上遮盖了整合素的结合位点, 还能通过 R9 侧面富集的负电荷阻止 FERM 结构域与细胞膜结合. 2013 年, 火鸡砂囊中提取的 Talin 1 全长的低分辨率(25Å)负染电镜结构得到解析, 作者结合 X 射线小角散射(small angle X-ray scattering, SAXS)和核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)结果得到了最终的结构模型, 表明 Talin 二体在抑制状态下确实呈现为紧密折叠的球状, 两个

Talin 分子的 ROD 结构域盘绕成“多纳圈”形(donut-shape)的结构, 两个头部结构域则并排占据了圈形的中心^[22]. 然而受限于较低的分辨率, 作者无法观察到具体的结构细节以及各结构域之间的相互作用及排列方式. 因此, 在 Talin 这样一个巨大的蛋白质中, 除了直接参与自抑制的 F3 与 R9 结构域外, 其他部分在自抑制/活化的变构过程中发挥着什么样的作用? 这仍是一个亟需解答的问题. 我们在本研究中分别解析了 TalinR9-10、R10-11 的双螺旋束结构, 分析了相邻螺旋束之间的相对朝向和夹角, 结果与前人的 SAXS 及电镜模型中的角度基本相符; 进一步通过叠合已有结构的重叠部分, 得到了 F2F3 与 R7-12 的结构模型, 结果显示 R7-12 呈现首尾相接的长链状构象, 而 R8 则凸出于长链之外, 恰好从空间上遮盖了 F2F3 与 R9 的结合位点; 此外 R8 上富集的正电荷也很可能排斥同样带正电的 F2F3. 凝胶排阻层析实验的结果与上述模型一致: R7-8 能够阻碍自抑制复合物的形成, 而 R10 则不影响 F3 与 R9 结合. 我们的工作为进一步阐明 Talin 的变构调控机制提供了结构基础.

1 材料与方法

1.1 克隆、表达与纯化

1.1.1 Talin 重组质粒的克隆

鼠源 Talin1 全长基因由美国克利夫兰医学研究院秦军教授提供. 设计特异性引物, 通过 PCR 扩增得到 Talin 1 R9-R10(1654~1973 a.a.)、R10-R11(1815~2140 a.a.)片段, 并通过对目的条带切胶回收、双酶切、连接至经本实验室改造的 pET28a 载体(在 5'端 6×组氨酸标签后加入了 PreScission Protease 酶切位点), 将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 并经过菌落 PCR 和测序鉴定得到阳性克隆. 提取阳性克隆质粒, 转化至 BL21 感受态细胞用于表达.

1.1.2 R9-10、R10-11 蛋白的表达与纯化

表达: 挑取 BL21 单菌落, 接菌至 5 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 于 37℃, 200 r/min 过夜培养后, 全部接入 800 ml LB 培养基中扩大培养, 至 A_{600} 达到 0.8 左右, 降温至 16℃, 并加入 0.2 mmol/L IPTG 低温诱导表达 20 h. 离心收集菌体后, 每 1 L 菌体用 40 ml PBS 缓冲液进行重悬.

纯化: 超声破碎菌体, 将破碎的菌液于 4℃, 16 000 r/min 高速离心 30 min, 收集上清, 将上

清液流穿镍柱进行亲和层析纯化, 用 100 ml 20 mmol/L 咪唑 -PBS 溶液洗去杂蛋白, 最后用 10 ml 300 mmol/L 咪唑 -PBS 溶液洗脱目的蛋白. 将目的蛋白加入超滤管(截留分子质量为 10 ku, Millipore 产)中, 3 500 *g* 离心, 待样品浓缩至 500 μ l 时加入预冷 PBS 至 15 ml, 继续浓缩至 500 μ l 时再次加入 PBS, 重复前述步骤至样品中咪唑含量低于 10 mmol/L. 向蛋白质样品中加入 PreScission Protease 于 4℃ 过夜, 酶切以除去 N 端的 6 $\times$ 组氨酸标签, 之后将样品再次流穿镍柱, 收集流穿液和 20 mmol/L 咪唑 -PBS 洗脱液即得到除去标签的目的蛋白. 将目的蛋白浓缩至 500 μ l, 高速离心后在 ÄKTA purifier 系统(GE Healthcare 产)上进行分子筛层析纯化. 使用的层析柱为 HiLoad 16/60 Superdex 75/200 (GE Healthcare 产), 分子筛缓冲液为: 20 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl. 根据系统检测的 UV₂₈₀ 吸收情况收集样品. 每一步纯化步骤得到的样品均通过 SDS-PAGE 进行检测.

1.2 结晶、数据收集及结构解析

1.2.1 R9-10、R10-11 的晶体筛选与优化

将纯化得到的蛋白样品分别浓缩至 10 g/L, 使用 Mosquito 机器人和商品化结晶条件试剂盒 (Hampton research、MCSG 产), 以 0.2/0.2 μ l 点坐滴板进行结晶条件筛选. R9-10、R10-11 在 1 周左右均有多个条件长出晶体, 通过梯度优化沉淀剂、pH、盐浓度等条件, 最终在下述条件得到了可用于收集数据的单晶. R9-10: 2% Tacsimate pH 4.0, 0.1 mol/L CH₃COONa pH 4.6, 16% PEG3350; R10-11: 0.2 mol/L NH₄Cl, 0.1 mol/L MES pH 6.0, 18% PEG6000.

1.2.2 数据收集与结构解析

在上海同步辐射光源 BL17U 晶体学线站收集到了分辨率分别为 2.2Å(R9-10)和 1.95Å(R10-11)的衍射数据, 以 talin-R9(PDB code: 2KBB)、R10(PDB code: 2KVP)和 R11(PDB code: 3DYJ)各自的结构为初始模型通过分子置换法确定相位解, 解析了 talinR9-10、R10-11 的晶体结构. 交替使用 Phenix 软件^[23]在倒易空间中自动修正结构以及 Coot 软件^[24]在正空间中手动修正结构.

1.3 分析性凝胶排阻层析实验

分析性凝胶排阻层析实验所用的缓冲液同前. 使用的凝胶层析柱为 Superdex200 10/300 (GE Healthcare 产). 为检测复合物的形成, 按分子摩尔比约 1:1 混合 F2F3(纯化方法见文献[21])与 R9-10

或 R7-9(纯化方法同 R9-10), 并在冰上孵育 1 h, 高速离心后上样. 通过 280 nm 的吸收值检测确定蛋白质的洗脱体积.

2 结果与讨论

2.1 Talin R9-10 的整体结构

Talin 尾部的 ROD 结构域由 13 个螺旋束组成, 每个螺旋束由 4~5 个 α 螺旋组成. 我们通过分子克隆, 成功地构建了 Talin R9-10(1654~1973 a.a.)、R10-11(1815~2140 a.a.)的重组表达质粒, 并利用大肠杆菌表达系统, 进行大量表达、纯化和结晶, 最终解析得到了分辨率分别达 2.2Å(R9-10)和 1.95Å(R10-11)的结构. 数据收集及结构修正统计见表 1.

Table 1 Data collection and refinement statistics

Data	R9-10	R10-11
Data collection		
Space group	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell parameters (a, b, c)	27.9, 50.7, 49.9	27.5, 94.9, 114.1
Cell parameters (α , β , γ)	110.0, 95.9, 97.1	90, 90, 90
Wavelength/Å	0.97930	0.97928
Resolution range/Å	50-2.20 (2.25-2.20)	50-1.95 (1.98-1.95)
Data completeness/%	97.3 (98.1)	96.7 (95.8)
Number of unique reflections	12624 (776)	22089 (1076)
Redundancy	3.9 (4.0)	6.3 (6.1)
Rmerge/%	7.4 (27.2)	8.0 (63.4)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	18.9 (8.1)	20.6 (3.3)
Refinement Statistics		
Rwork/%	20.9	19.5
Rfree/%	25.3	23.7
r.m.s.d. bonds/Å	0.004	0.006
r.m.s.d. angles/Å	0.913	0.902
Average B-factor/Å ²	36.9	28.1
Number of protein atoms	2401	2324
Number of Solvent atoms	94	299
Ramachandran plot statistics/%		
Preferred	293	309
Allowed	8	10
Outliers	3	0

2.1.1 R9-10 的整体结构

R9-10 晶体的空间群为 P1, 相对较为罕见. 同时每个不对称单位中含有一个蛋白质分子, 不存在在进一步提升晶体学对称性的可能. 单独的 R9、R10 结构域均为由 5 个 α 螺旋(α 1-5, α' 1-5)组成的

螺旋束结构(图 1b, c), 此前已有 R9 和 R10 各自独立的 NMR 结构^[25-26](R9: 1655 ~ 1822 a.a., pdb code: 2KBB; R10: 1815 ~ 1973 a.a., pdb code: 2KVP), 以及我们报道的 R9/F2F3 的自抑制复合物结构(PDB code: 4F7G). 将 R9-10 结构与单螺旋束的 NMR 溶液结构进行比较, R9-10 与单独 R9 结构的主链 rmsd 为 1.001Å, 与 R10 结构的 rmsd 为 0.705Å, 说明单个螺旋束的整体结构高度一致, R9 与 R10 共同存在时并不影响各自螺旋束的结构. 每个螺旋束均由 5 个两亲性的 α 螺旋反平行排列组成, 朝向外外部溶液环境的一侧大多为亲水性残基, 而内侧形成的疏水核心稳定了整个螺旋束的结构. 每个螺旋束的 $\alpha 2 \sim 5$ 均以上 - 下 - 上 - 下的方式折叠成左手 4-螺旋束 (left-handed up-down-up-down 4-helix bundles), 其各螺旋间的

连接区较短(3~6 a.a.), 而 $\alpha 1$ 则通过一段较长的柔性区(10~11 a.a.)与 $\alpha 2$ 相连. 不论在 R9-10 的晶体结构还是 NMR 结构中, 该连接区均表现出较大的柔性. 这种拓扑方式与此前解析的 Talin 尾部的其他 5-螺旋束(R1、R5、R6、R7、R9-R13)均相同^[18]; 且该拓扑特征目前只在 Talin 中被发现^[17,27]. 此外, 在 F2F3/R9 复合物结构中, F3 通过两段突出的 loop 区与 R9 的 $\alpha 1/\alpha 3/\alpha 5$ 一侧结合, 与 R9-10 进行重叠后, R10 在空间上不影响 F2F3 的结合; 重叠后 R9 主链的 rmsd 值为 1.512Å, 表明结合 F3 与否对于 R9 的整体结构并没有产生显著地影响; 而涉及 R9 与 F3 相互作用的 8 个主要残基中, 只有 E1770 和 M1802 的侧链朝向在结合 F3 前后有微小的区别, 这一结果表明 R9 稳定的螺旋束结构始终处于利于 F3 结合的状态.

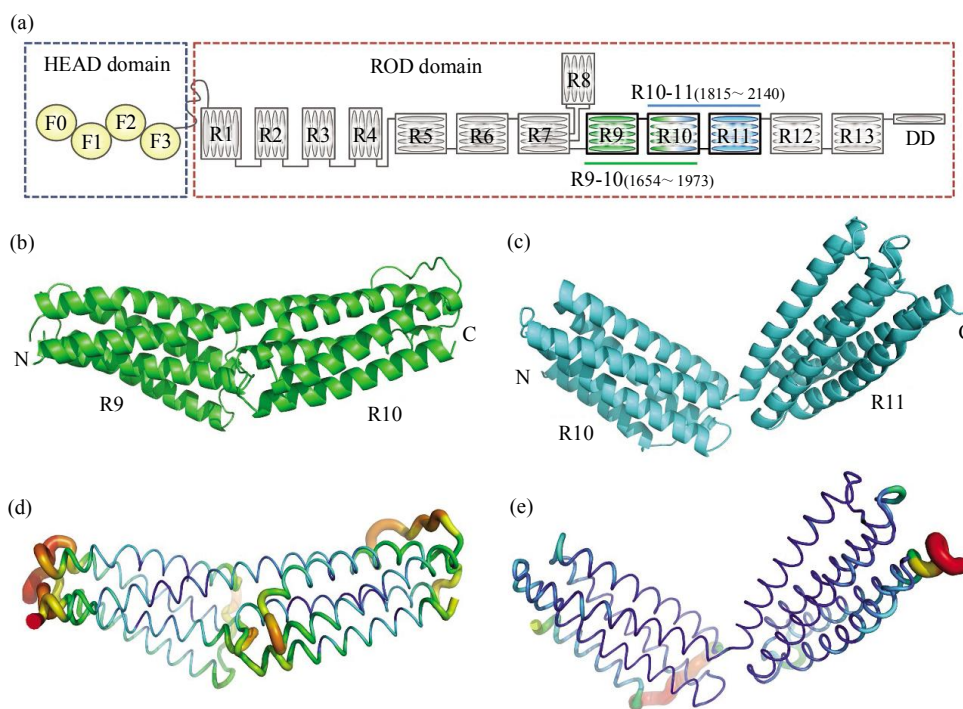


Fig. 1 Overall structures of Talin R9-10 and R10-11

(a) Schematic diagram of Talin showing the N-terminal HEAD domain (residues 1 ~ 400) containing F0 and a FERM domain (F1, F2, and F3) and the C-terminal ROD domain (residues 482 ~ 2541) containing 62 α -helices (ovals) organized into 13 helical bundles (R0-R13). Residue numbers for R9-10 and R10-11 are indicated. (b) The overall structure of R9-10 (green). (c) The overall structure of R10-11 (cyan). (d) B-factor presentation of R9-10 shown in the same orientation as in (b). The colors from blue to yellow and to red indicate B-factors from small to large. The sickness of every ribbon segment is proportional to the average B-factor of the segment. (e) B-factor presentation of R10-11 shown in the same orientation as in (c).

R9-10 结构中, 两个螺旋束之间由¹⁸²¹AGVVGG¹⁸²⁶连接, 尽管该序列中含有 3 个甘氨酸残基, 但在晶体结构中并没有形成无规则的柔性区, 而是与前后序列共同组成了一段很长的 α 螺

旋(H_L, T1785-E1840), 螺旋的 N 端前半段(T1785-S1819)参与形成 R9 螺旋束, C 端后半段(A1820-E1840)参与形成 R10 螺旋束(图 2a), 连接区的骨架氢键呈现为标准的 α 螺旋骨架氢键. 有

有趣的是, H_L 中残基的亲水性在整个螺旋 N 端与 C 端的分布恰好是相反的, 朝向 R9 及 R10 螺旋束内部的一侧均为疏水残基, 暴露在溶液的一侧均为亲水性及酸性残基, 从而使得 R9 和 R10 交错排列在 H_L 的两侧(图 2b), 两螺旋束之间形成大约 150° 的夹角. R9 和 R10 之间除 H_L 的连接之外, 几乎没有其他直接的相互作用, 除了一个水分子(Wat4)同时和 R9 $\alpha 4$ N 端的 S1754 以及位于 R10 $\alpha' 4$ C 端的 S1940 侧链羟基氧形成氢键(图 2c). 在我们之前报道的 F2F3/R9 自抑制复合物结构中, 尽管其中 R9 构建(起止位点为 1654~1847 a.a.)的 C 端涵盖了 H_L 的全部序列, 但在该结构中 R9 的 C 端螺旋以 A1821 结尾, G1825-E1847 部分的电子密度缺失了, 说明无 R10 的情况下, 该螺旋的后半段处于高度柔性的无规则卷曲状态. R9-10 的这种构象也许只是 Talin 变构过程中的可能构象之一, 虽然目前的晶体排列有利于连接区形成连续的 α 螺旋结构, 但富含甘氨酸的连接区也同样易于形成柔性的无规则构象, 从而使 R9 与 R10 之间的角度发生变化. 连接区 xGxVxG 的排列在人、鼠、鸡、果蝇以及线虫中都是保守的, 提示了其在维持 Talin 整体结构中的重要性, 以及在螺旋 / 柔性区之间发生变构的可能性.

2.1.2 R10-11 的整体结构

R10-11 晶体的空间群为 $P2_12_12_1$, 每个不对称单位中含有一个分子. R11 同样是由 5 个两亲性的 α 螺旋($\alpha' 1 \sim 5$)反平行排列组成的左手螺旋束, 拓扑结构也与 Talin 其他 5-螺旋束高度相似, $\alpha' 1$ 通过一段 10 a.a. 的柔性区与上 - 下 - 上 - 下排列成左手螺旋束的 $\alpha' 2-5$ 相连. 将 R10-11 与 R11-12 的晶体结构中的 R11 进行重叠后, 主链的 rmsd 值为 $0.569 \text{ \AA}$.

在 R10-R11 结构中, 两螺旋束之间的连接区很短, 两个螺旋通过 $^{1971}\text{GNR}^{1973}$ 相连并形成约 120° 的夹角, 使得 R10 和 R11 以“V”字形排列. 在 R10 与 R11 的连接区附近形成了丰富的氢键网络: 连接区两侧的 Q1969 与 Q1976 的酰胺基之间形成了 $3.12 \text{ \AA}$ 的氢键, 而位于 R10 $\alpha' 2$ N 端的 1854Q 与连接区的 1972N 的侧链酰胺基相互作用, 形成了 $2.73 \text{ \AA}$ 的氢键, 同时 R10 上的 1908E 侧链羧基氧与 2041Q(位于 R11 $\alpha' 3$ 的 N 端)骨架主链上的氨基形成了 $2.74 \text{ \AA}$ 的氢键(图 2d). 这些氢键作用降低了 R10 和 R11 之间连接区的柔性, 使得两个螺旋束彼此的朝向相对稳定. 连接区与周围螺旋区域的 B

因子值均处于较低的水平($\leq 32.57 \text{ \AA}$), 也证实了连接区的相对稳定性(图 1e).

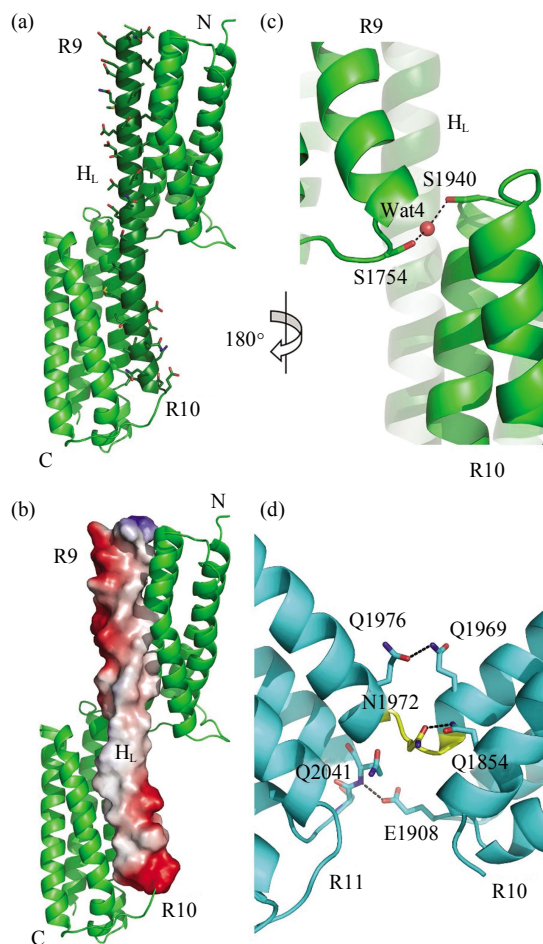


Fig. 2 The linker regions of R9-10 and R10-11

(a) The linker region between R9 and R10 adopts a α -helical conformation and fuses the last helix of R9 and the first helix of R10 into a long α -helix (residues 1785~1819, termed H_L , colored in dark green). The side chains in H_L are shown as sticks and colored in red for oxygen atoms, blue for nitrogen atoms. (b) Electrostatic surface representation of H_L shows its unique amphipathicity distribution. The blue area represents positive charge enriched region and red area indicates negative charge enriched region. (c) The hydrogen bonds formed between S1754 in R9 and S1940 in R10 via water molecule Wat4 are presented as black dashed lines. (d) The hydrogen bond network around the linker region (yellow) stabilizes the relative orientations of R10 and R11. The hydrogen bonds are shown as black dash lines, and the involved residues are shown as sticks.

2.2 晶体结构与 SAXS、电镜结果的比较

前人利用 SAXS 和 NMR 方法, 对 Talin ROD 结构域的所有相邻两螺旋束进行体外重组表达纯化, 测定了每个双螺旋束在溶液中的形状以及各相

邻螺旋束之间的夹角和相对朝向^[2], 结果表明, Talin ROD 尾部的各螺旋束之间均由类似铰链的连接区连接, 在不破坏螺旋束首尾相接的情况下能够进行有限的相对运动, 这样的拓扑性质使得 Talin ROD 区域可能采取更加伸展和灵活的构象. SAXS 结果显示 R9-10 在溶液中的夹角为 129° , 比我们在晶体结构中观察到的(约 150°)略小, R10-11 在溶液中的夹角为 124° , 与我们的晶体结构(约 120°)基本吻合. 作者根据 SAXS 结果进行装配, 得到的电镜结构三维模型中的 R9-10、R10-11 夹角分别为 147° 和 137° , 与晶体结构相比, 这一结果与 R9-10 的夹角基本吻合但比 R10-11 略大. 三种不同的结果说明 Talin ROD 结构域的各部分在不同环境下可以通过柔性的连接区采取不同的相对朝向, 导致蛋白整体呈现不同的构象状态, 进而实现 Talin 自抑制/活化的变构调控.

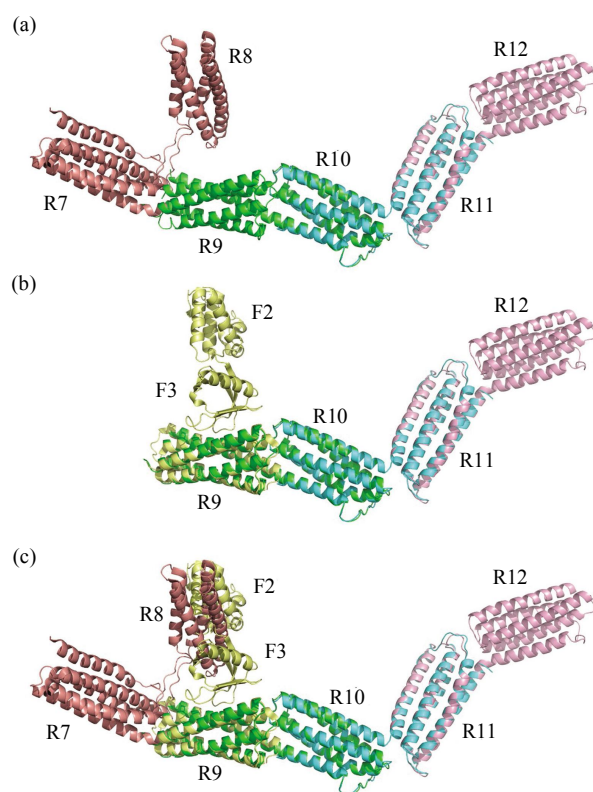


Fig. 3 Modeling of the F3-Rod binding mechanism

(a) Superposition of the structures of R7-8 (salmon), R9-10 (green), R10-11 (cyan) and R11-12 (pink). (b) Superposition of the structures of F2F3/R4 complex (yellow), R9-10 (green), R10-11 (cyan) and R11-12 (pink). R9-12 adopts an extended conformation which allows F3 binding to R9. (c) Superposition of all the above structures in (a) and (b). R8 occupies the position for F3 binding and might play a role in the regulation of Talin auto-inhibition.

2.3 R8 阻碍 F3 与 R9 的结合

鉴于晶体结构中 R9、R10、R11 之间的夹角与溶液状态及电镜结构基本吻合, 我们将 R9-10、R10-11 的晶体结构与序列上有重合区段的 R7-8 (pdb code: 2X0C)、R11-12 结构(pdb code: 3DYJ)重叠在一起, 得到了与 Talin 自抑制直接相关的 ROD R7-12 的拼接结构模型. R8 是其中唯一的 4-螺旋束, 但并未接在 R7 尾部, 而是插入了 R7 螺旋束 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 之间的 loop 区, 被 R8 分为两段的 loop 形成了类反平行 β 片层的结构. 尽管 R7 和 R8 之间除 loop 的连接以外没有其他相互作用, 但类 β 片层的氢键作用降低了连接区的柔性, 使得 R7 与 R8 之间朝向的可变性受到了一定程度的限制^[17]. 在 R11-12 的双螺旋束晶体结构中, 两个螺旋束也像 R9-10 一样由连续的长螺旋连接, 但在两个螺旋束的相邻处出现了扭结(kink), 使得 R11 和 R12 之间形成了一定的夹角, 呈 V 字形排列. 此外与 R9-10 不同的是, 该长螺旋残基的亲水性分布在 N、C 端是相同的, 导致 R11 和 R12 均位于长螺旋的同一侧. 重叠后得到的 R7-12 模型中, 序列重叠部分的螺旋束结构(R10、R11)能够较好地重合, 说明周围螺旋束的存在对于单个螺旋束的构象基本没有显著影响. R7-12 的整体结构呈现出较为伸展的构象, R7 的 5-螺旋束通过一段短连接区与 R9 及其他 5-螺旋束形成首尾相接、线性排列的长棒状, 而 R8 的 4-螺旋束则凸出于整个长棒之外, 几乎呈垂直角度(图 3a). 这一模型与前人的 SAXS 结果相符: R7 与 R9 通过短 loop 相连, 而 R8 伸出的位置靠近 R7 和 R9 之间的连接区, 使得 R7-9 片段在溶液中表现为“三叶草”状结构. 将 F2F3/R9 的复合物结构同时与 R9-12 重叠之后的模型显示, R9-12 延伸的长轴方向与 F2F3 的长轴近似垂直, 不会对 F3 接近 R9 形成空间位阻, 因而 R10-12 的存在不影响 F3 与 R9 的结合(图 3b); 而将 F2F3/R9 与 R7-12 的结构进行重叠后的模型中, 凸出于长链的 R8 所处的位置恰好遮盖住了 R9 与 F3 相互作用的位点, 从空间上阻碍了自抑制状态的形成(图 3c). 这一结构模型也与凝胶排阻层析实验的结果相符合: 体外表达纯化的 F2F3 能够与 R9-10 结合, 以复合物的形式共同出峰(图 4a, b); 而 F2F3 与 R7-9 共孵育后并没有形成复合物, 依然保持各自的出峰位置(图 4c, d). 此外, Talin ROD 上各螺旋束的等电点均为酸性 pH 值($4.4 \sim 6.1$), 表面带负电, 唯独 R8 的等电点为 7.8, 表面带正电荷, 尽管有报道称

R8 不能结合磷脂^[7], 但有趣的是, F2F3 同样表面富集正电荷, R8 迥异于其他 ROD 区域的带正电性使得其不仅能在空间上阻止 F3 与 R9 接近, 而且很可能利用同种电荷排斥 F2F3, 从而在 Talin 的自抑制 / 活化过程中发挥重要的调控作用. 这一结构

模型为伸展的 Talin ROD 中部为何出现了单独一段凸出的 R8 提供了可能的解释. 值得注意的是, 各螺旋束之间是通过具有一定柔性的铰链区连接, 因此我们的模型只是提供了 Talin 在变构的动态过程中的一种可能的稳定状态.

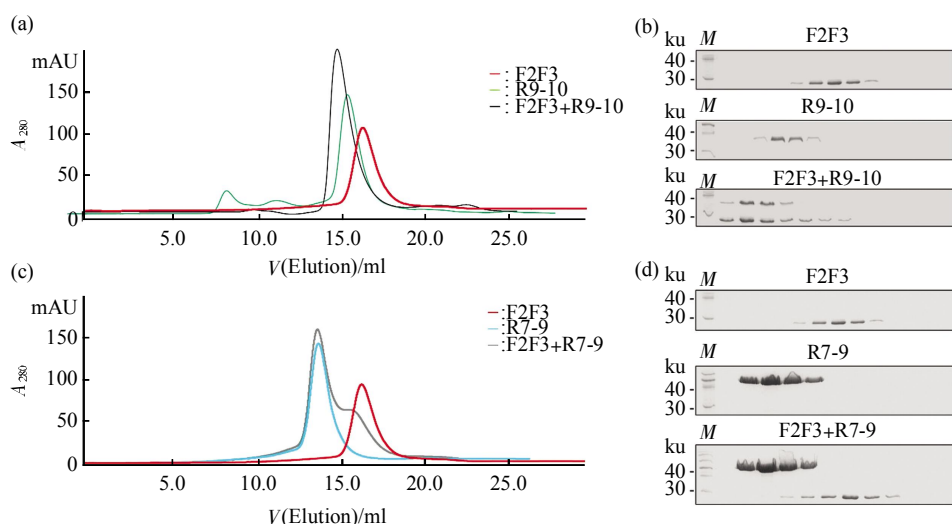


Fig. 4 Validation of the F3-Rod binding mechanism

(a) Analysis of the interactions between Talin F2F3 and R9-10 by gel filtration. (b) SDS-PAGE of the same elution fractions of each gel filtration run shown in (a) indicates that F2F3 and R9-10 were co-eluted as complexes. (c) Analysis of the interactions between Talin F2F3 and R7-9. (d) SDS-PAGE of the same elution fractions of each gel filtration run shown in (c) indicates that F2F3 and R7-9 failed to form complexes.

3 结 论

Talin 作为整合素唯一的直接激活分子, 在细胞黏附、迁移等大量细胞-胞外基质相互作用相关的生理病理过程中发挥着关键的调控作用. 过度的 Talin 活性将会导致整合素功能失调, 与多种人类疾病, 如血栓、中风、癌症转移等病理现象的产生相关^[28]. 因此阐明 Talin 是如何实现自抑制/活化的变构调控过程, 对于人们理解整合素活化及细胞迁移的上游调控机制以及各种疾病的产生机理有着重大的意义. 然而, 目前对 Talin 自抑制状态及其调控机制的了解非常有限. 此前我们报道了 F2F3 与 R9 形成 Talin 自抑制状态复合物的结构, 为阐明 Talin 的调控机制提供了重要的结构基础. 但是, 在整体的 Talin 蛋白中, 除了直接参与自抑制的结构域外, Talin 的其他部分, 特别是与 R9 相邻的部分, 在自抑制/活化的转化过程中发挥着什么样的作用, 这仍是一个需要解答的问题. Talin 的 ROD 结构域由 13 个连续的螺旋束组成, 尽管 Talin 所有结构域的结构都已得到解析, 但除了 R1-2

(482~789 a.a., pdb code: 1SJ8)R7-8(1359~1659 a.a.)、R11-12(1974~2293 a.a.)是同时包含双螺旋束的结构外, Talin 尾部的其他结构域都只得到了单螺旋束的结构. 解析双螺旋束的结构对于阐明相邻螺旋束的排列朝向有着重要的意义. 我们分别解析了 TalinR9-10、R10-11 的双螺旋束晶体结构, 发现 R9 和 R10 之间富含甘氨酸的连接区与前后序列共同形成了一段很长的 α 螺旋 H_L , H_L 上亲/疏水性残基的分布方式使得 R9 和 R10 交错排列在 H_L 的两侧, 形成约 150° 的夹角; 连接区上高度保守的 xGxVxG 序列利于发生变构, 很可能在 Talin 自抑制/活化的动态过程发挥折叠/伸展的作用. R10-11 双螺旋束的连接区附近形成的氢键网络稳定了 R10 和 R11 的相对朝向, 使得二者之间形成了约 120° 的夹角. 晶体结构中观察到的夹角与前人的 SAXS 及电镜结果相吻合. 结合其他已知结构 (R7-8、R11-12、F2F3/R4) 得到的拼接结构模型发现, R7 以及 R9-12 首尾相接形成了伸展的长棒, R10-12 不影响自抑制复合物的形成; R8 凸出于长棒之外, 不仅能够直接在空间上阻碍 F3 与 R4 结

合, 同时很可能通过表面正电荷排斥同样带正电的 F2F3。这一结果进一步得到了凝胶排阻层析实验的验证, 提示 R8 螺旋束很可能在 Talin 的自抑制/活化过程中发挥重要的调控作用。我们的工作为进一步阐明 Talin 的变构调控机制提供了结构基础。

参 考 文 献

- [1] Burridge K, Connell L. A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *The Journal of Cell Biology*, 1983, **97** (2): 359–367
- [2] Albigesrizo C, Frachet P, Block M R. Down-regulation of Talin alters cell-adhesion and the processing of the Alpha-5-Beta-1 integrin. *J Cell Sci*, 1995, **108**(Pt10): 3317–3329
- [3] Priddle H, Hemmings L, Monkley S, *et al.* Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 1998, **142**(4): 1121–1133
- [4] Zhang X, Jiang G, Cai Y, *et al.* Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol*, 2008, **10**(9): 1062–1068
- [5] Monkley S J, Zhou X H, Kinston S J, *et al.* Disruption of the talin gene arrests mouse development at the gastrulation stage. *Dev Dynam*, 2000, **219**(4): 560–574
- [6] Critchley D R. Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu Rev Biophys*, 2009, **38**: 235–254
- [7] Critchley D R, Gingras A R. Talin at a glance. *J Cell Sci*, 2008, **121**(9): 1345–1347
- [8] Turner C E, Burridge K. Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. *Current Opinion in Cell Biology*, 1991, **3**(5): 849–853
- [9] Calderwood D A, Zent R, Grant R, *et al.* The talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(40): 28071–28074
- [10] Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, *et al.* A structural mechanism of integrin alpha(IIB)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell*, 2002, **110**(5): 587–597
- [11] Tadokoro S, Shattil S J, Eto K, *et al.* Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 2003, **302**(5642): 103–106
- [12] Goult B T, Bouaouina M, Elliott P R, *et al.* Structure of a double ubiquitin-like domain in the talin head: a role in integrin activation. *Embo J*, 2010, **29**(6): 1069–1080
- [13] Wegener K L, Partridge A W, Han J, *et al.* Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, 2007, **128**(1): 171–182
- [14] Bouaouina M, Lad Y, Calderwood D A. The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta 1 and beta 3 integrins. *J Biol Chem*, 2008, **283**(10): 6118–6125
- [15] Gingras A R, Bate N, Goult B T, *et al.* The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *Embo J*, 2008, **27** (2): 458–469
- [16] Papagrigoriou E, Gingras A R, Barsukov I L, *et al.* Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *Embo J*, 2004, **23**(15): 2942–2951
- [17] Gingras A R, Bate N, Goult B T, *et al.* Central region of talin has a unique fold that binds vinculin and actin. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(38): 29577–29587
- [18] Goult B T, Zacharchenko T, Bate N, *et al.* RIAM and vinculin binding to talin are mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(12): 8238–8249
- [19] Molony L, Mccaslin D, Abernethy J, *et al.* Properties of talin from chicken gizzard smooth muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, **262**(16): 7790–7795
- [20] Goksoy E, Ma Y Q, Wang X, *et al.* Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Molecular Cell*, 2008, **31**(1): 124–133
- [21] Song X Q, Yang J, Hirbawi J, *et al.* A novel membrane-dependent on/off switch mechanism of talin FERM domain at sites of cell adhesion. *Cell Res*, 2012, **22**(11): 1533–1545
- [22] Goult B T, Xu X P, Gingras A R, *et al.* Structural studies on full-length talin1 reveal a compact auto-inhibited dimer: implications for talin activation. *Journal of Structural Biology*, 2013, **184**(1): 21–32
- [23] Adams P D, Afonine P V, Bunkoczi G, *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D*, 2010, **66**(Pt2): 213–221
- [24] Emsley P, Lohkamp B, Scott W G, *et al.* Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D*, 2010, **66**(Pt4): 486–501
- [25] Goult B T, Gingras A R, Bate N, *et al.* The domain structure of talin: Residues 1815–1973 form a five-helix bundle containing a cryptic vinculin-binding site. *Febs Lett*, 2010, **584**(11): 2237–2241
- [26] Goult B T, Bate N, Anthis N J, *et al.* The structure of an interdomain complex that regulates talin activity. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(22): 15097–15106
- [27] Holm L, Sander C. Dali—a network tool for protein-structure comparison. *Trends Biochem Sci*, 1995, **20**(11): 478–480
- [28] Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, **9**(10): 804–820

Structural Study on Two Tandem Helix Bundles of The ROD Domain of Talin, an Integrin Activator*

LIN Lin^{1,2)}, SONG Xian-Qiang¹⁾, YE Sheng^{1)**}, ZHANG Rong-Guang^{1)**}

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Talin, as the activator of integrin and the adaptor between the cytoskeleton and integrin, plays a key role in a series of processes such as cell adhesion and migration. The activation of integrin involves F3 subdomain of Talin-FERM domain binding the cytoplasmic tail of integrin β -subunit. Talin has two states: auto-inhibited and activated. We previously reported the auto-inhibition complex structure of Talin F2F3/R9, in which the integrin binding site F3 interacts with R9(1654~1822 a.a.) of Talin-ROD, such that integrin cannot be activated. However, besides F3 and R9, it remains unclear what structural or functional roles the other domains of the 270 ku Talin play in the regulation of its activation. Here we solved the crystal structures of Talin R9-R10 (1654~1973 a.a.) and R10-R11 (1815~2140 a.a.), respectively. R9, R10 and R11 are all 5-helix bundles. R9 and R10 is joined together by a long α -helix instead of a flexible loop, and the two bundles are located at the opposite sides of the long helix with an angle of about 150°. The linker between R10 and R11 is stabilized by neighboring hydrogen bonds, forming an angle of about 120° between the two bundles. These angles observed in our crystal structures are consistent with the previously reported SAXS and EM results. After superimposition of R9-10, R10-11 with previously reported structures of R7-8 and R11-12, a model of R7-12 was acquired, which adopts an elongated linear conformation, except that R8 protrudes from the ROD. According to this model, R10-12 does not intrude the interaction between F3 and R9, whereas R8 not only masks the F3 binding site of R9, but also might electrostatically hinders F2F3 approaching *via* its unique positively charged surface. This hypothesis was further verified by the results of size exclusion chromatography. Our work provides a new structural basis for studying the mechanism of Talin auto-inhibition.

Key words Talin, R9-10, R10-11, crystal structure, tandem helix bundles, auto-inhibition

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0081

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31470792, 31271491).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888637, E-mail: rzhang@ibp.ac.cn

Received: March 25, 2015 Accepted: June 1, 2015